

**AMYLOID BETA-PROTEIN COAGULATION/DEPOSITION INHIBITOR****Publication number:** JP8193026**Publication date:** 1996-07-30**Inventor:** TOMIYAMA TAKAMI; SUWA YORIMASA; ENDO NORIAKI**Applicant:** TEIJIN LTD**Classification:**

- **International:** A61K31/05; A61K31/047; A61K31/12; A61K31/122;  
A61P25/28; A61P43/00; C07C39/08; C07C39/14;  
C07C50/04; A61K31/045; A61K31/12; A61K31/122;  
A61P25/00; A61P43/00; C07C39/00; C07C50/00;  
(IPC1-7): A61K31/05; A61K31/12; C07C39/08;  
C07C39/14; C07C50/04

- **European:**

**Application number:** JP19950003144 19950112**Priority number(s):** JP19950003144 19950112[Report a data error here](#)**Abstract of JP8193026**

**PURPOSE:** To obtain an amyloid &beta;-protein coagulation and/or deposition inhibitor useful for preventing and treating Alzheimer's disease, containing, as active ingredient, a hydroquinone or quinone compound.

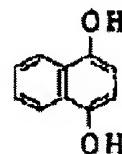
**CONSTITUTION:** This inhibitor contains, as active ingredient, 1-70 (pref. 5-50)wt.% of a hydroquinone or quinone compound of formula I, II or III. Using an appropriate vehicle etc., this inhibitor can be manufactured into pharmaceutical preparations in the form of an oral agent such as capsules, tablets, granules, powder, suspension, liquid or syrup, an injection, suppository, or agent for external use. The hydroquinone or quinone compound has activity to inhibit amyloid &beta;-protein coagulation and/or deposition and also has action of suppressing the neurocytotoxicity due to amyloid &beta;-protein.



I



II



III

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-193026

(43)公開日 平成8年(1996)7月30日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/05	AED			
31/12	AAM			
C 0 7 C 39/08		9155-4H		
39/14		9155-4H		
50/04		9049-4H		

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全5頁)

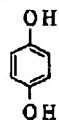
(21)出願番号	特願平7-3144	(71)出願人	000003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(22)出願日	平成7年(1995)1月12日	(72)発明者	富山 貴美 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(72)発明者	諫訪 順正 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(72)発明者	遠藤 則明 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人 株式会社東京研究センター内
		(74)代理人	弁理士 前田 純博

(54)【発明の名称】 アミロイドβ蛋白凝集・沈着阻害剤

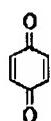
(57)【要約】

【目的】 新規なアミロイドβ蛋白凝集・沈着阻害剤を提供する。

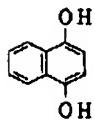
【構成】 下記式 [I]、[II] または [III]



… [I]



… [II]



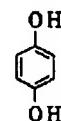
… [III]

で表わされるハイドロキノン類またはキノン類を有効成分として含有するアミロイドβ蛋白凝集及び／または沈着阻害剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記式 [I]、[II] または [III]

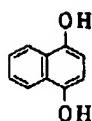
【化1】



… [I]



… [II]



… [III]

で表わされるハイドロキノン類またはキノン類を有効成分として含有するアミロイド $\beta$ 蛋白凝集及び／または沈着阻害剤。

【請求項2】 有効成分として、上記式 [I]、[II] または [III] で表わされるハイドロキノン類またはキノン類を含有する、アミロイド $\beta$ 蛋白凝集及び／または沈着阻害作用に基づくアルツハイマー型痴呆症の治療剤または予防剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着阻害剤に関する。さらに詳しくは、ハイドロキノン類またはキノン類を活性成分として含有するアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着阻害剤等に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 アミロイド $\beta$ 蛋白は、アルツハイマー病患者の脳に見られる特徴的病理変化の一つである老人斑の、アミロイドコアを形成する主要構成成分で、39—43アミノ酸からなるペプチドであり、膜貫通型のアミロイド前駆体蛋白APP (Amyloid Protein Precursor の略) の酵素的分解により生成する（例えば、MORI, H. ら (1992年) THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 第267巻17082~17086頁、LANSBURY, P. T., Jr. (1992年) BIOCHEMISTRY第31巻6865~6870頁、SISODIA, S.S. ら (1990年) SCIENCE 第248巻492~495頁、MULLAN, M. ら (1993年) TRENDS IN NEUROSCIENCE第16巻398~403頁など参照）。化学合成したアミロイド $\beta$ 蛋白等を用いた実験から、かかるアミロイド $\beta$ 蛋白は自己凝集性が強く（例えば、JARRETT, J.T. ら (1993年) CELL第73巻1055~1058頁、BURDICK, D. ら (1992年) THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 第267巻

546~554頁、FRASER, P.E. ら (1992年) BIOCHEMISTRY第31巻10716~10723頁など参照）、また凝集したアミロイド $\beta$ 蛋白は神経細胞に対し直接細胞毒性を示し得ることや、興奮性アミノ酸等による細胞傷害に対する感受性を高めることなどが報告されている（例えば、PIKE, C.J. ら (1993年) THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE第13巻1676~1687頁、MATTSON, M.P. ら (1993年) TRENDS IN NEUROSCIENCE第16巻409~414頁など参照）。具体的には、アミロイド $\beta$ 蛋白の部分ペプチド $\beta$ 25—35（アミノ酸配列 G S N K G A I I G L M）が神経細胞毒性を示すこと、及び、 $\beta$ 25—35の作用点の一つは神経細胞のミトコンドリア電子伝達系であり、細胞のMTT (3-(4, 5-dimethylthiazol -2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 還元能低下作用を測定することにより、細胞毒性の強度を知ることができること、が既に報告されている（Yankner ら、Science, 250, 279—282, 1990；金子ら、神経化学、32, 148—149, 1993）。さらには、アミロイド $\beta$ 蛋白の脳内への沈着による老人斑の形成は、アルツハイマー病患者脳のもう一つの特徴的病理変化である神經原線維変化よりも早期から出現する病理的変化であることが知られている（例えば、SEJKOE, D.J. (1991年) NEURON第6巻487~498頁、RUMBLE, B. ら (1989年) THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE 第320巻1446~1452頁など参照）。すなわち、アルツハイマー病においては、アミロイド $\beta$ 蛋白の脳組織中の凝集・沈着が引き金となり老人斑が形成され、その結果、神経細胞死が惹起され痴呆症となるとする発症機序が有力である。

【0003】 従って、アミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着を阻害する薬剤は、アルツハイマー型痴呆症の治療薬及び／または予防薬として有用であることが期待される。かかる阻害活性を有する薬物として、リファマイシン類に関する報告がある（例えば、TOMIYAM, T. ら (1994年) BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 第204巻76~83頁など参照）が、ハイドロキノン、キノン等が、アミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着を阻害する活性を有することは報告されていない。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着を阻害する薬剤を提供することを目的としている。さらに本発明は、アミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着阻害作用に基づくアルツハイマー病の治療剤または予防剤を提供することを目的としている。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、アミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着を阻害する薬剤の可能

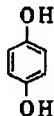
性を鋭意検討した結果、本発明におけるハイドロキノン類またはキノン類がアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着を阻害する活性を有し、さらにはアミロイド $\beta$ 蛋白による神経細胞毒性を抑制する作用を有することを見出しことを出し、本発明に到達した。

【0006】

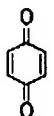
【発明の構成及び作用効果】すなわち本発明は、下記式 [I]、[II] または [III]

【0007】

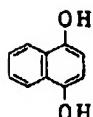
【化2】



… [I]



… [II]



… [III]

【0008】で表わされるハイドロキノン類またはキノン類を活性成分として含有するアミロイド $\beta$ 蛋白凝集及び／または沈着阻害剤、及び有効成分として上記式 [I]、[II] または [III] で表わされるハイドロキノン類またはキノン類を含有する、アミロイド $\beta$ 蛋白凝集及び／または沈着阻害作用に基づくアルツハイマー型痴呆症の治療剤または予防剤である。

【0009】本発明に関するハイドロキノン類、キノン類は、いずれも公知の化合物であり、例えば、ハイドロキノン、P-ベンゾキノン、1, 4-ジヒドロキシナフタレンなどは試薬として入手可能である。

【0010】本発明のアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着阻害剤は、好ましくは製薬学的に許容される担体を配合することによって、本発明のアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着阻害剤として用いることができる。この場合の製薬学的に許容される担体としては、後記賦形剤と同様のものを挙げることができる。この場合の本発明の化合物と担体との配合量については、後記のような活性成分の投与量に従うが、特に限定されず広範囲に選択され、通常本発明のハイドロキノン類またはキノン類は全組成物中1～70重量%、好ましくは5～50重量%である。得られた組成物は、さらに公知の方法で適当な賦形剤等を用いて軟カプセル剤、硬カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤、懸濁剤、液剤、シロップ剤等の経口剤、注射剤、坐剤または外用剤として提供される。かかる賦形剤としては植物油（例えばトウモロコシ

油、綿実油、ココナッツ油、アーモンド油、落花生油、オリーブ油等）、中鎖脂肪酸グリセライド油等の油状エステル、鉱物油、トリカブリリン、トリアセチン等のグリセリンエステル類、エタノール等のアルコール類、生理食塩水、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、動物油脂、セルロース誘導体（結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース）、ポリビニルピロリドン、デキストリン、乳糖、マンニトル、ソルビトール、デンプン等が挙げられる。

【0011】本発明のハイドロキノン類またはキノン類は、アミロイド $\beta$ 蛋白の凝集及び／または沈着を阻害する活性を有し、アルツハイマー型痴呆症の治療薬及び／またはその予防薬として有用である。

【0012】本発明において用いられた各種試験方法及び測定方法は、以下のとおりである。

【0013】(1) アミロイド $\beta$ 蛋白凝集阻害活性の試験方法

チオフラビンTを用いる方法により実施した。

【0014】チオフラビンT (ThT) という色素は、アミロイド $\beta$ 蛋白などの凝集した蛋白の $\beta$ シート構造に結合して、遊離の状態では示さなかった新たな蛍光（482 nm）を発することが報告されている (Harry LeVine III. 1993, ProteinScience 2, 404～410)。蛍光の強さは結合する蛋白の凝集の程度に比例する。薬剤を含むアミロイド $\beta$ 蛋白の凝集の程度をそれに結合する ThT の蛍光の強さで測定することにより、薬剤のアミロイド $\beta$ 蛋白凝集阻害活性を調べることができる。

【0015】具体的には、ある薬剤を含むアミロイド $\beta$ 蛋白の試料溶液から 10  $\mu$ l を取り、これを 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に 3  $\mu$ M の濃度で溶かされた ThT の溶液 1 ml に加え、攪拌する。攪拌後、すみやかに、スペクトロフルオロメーター (JASCO 製) を用いて、励起波長 450 nm、蛍光波長 482 nm で溶液の蛍光を測定する。経時に測定を行ない、薬剤を含まないアミロイド $\beta$ 蛋白のみの溶液と比較して、一定期間蛍光の上昇が抑えられれば、その薬剤はアミロイド $\beta$ 蛋白凝集阻害活性を持つと判定される。

【0016】(2) PC12細胞を用いたアミロイド $\beta$ 蛋白の神経細胞毒性測定法

(a) 細胞の調製

理化学研究所細胞バンクより分与された PC12 細胞 (RCB0009, Lot 6) を用いた。本細胞はラット副腎髓質由来のクローニング細胞であり、NGF 存在下で培養することにより交感神経節細胞様に分化する (Greene 及び Tischler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 : 2424～2428, 1976) ことから、神経細胞のモデル系として汎用されている。

【0017】培養は 10 %ウマ血清 (Gibco 製) 及

び5%準胎児ウシ血清(三菱化成製)を含むRPMI 1640(Gibco製)を培地として用い、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で行う。細胞を5,000/wellで96穴培養プレート(住友ベークライト製、SUMILON CELL TIGHT C-1)に巻き込み、翌日にD-glucose不含、50ng/ml/NGF(シグマ製、ラット頸下腺由来)含有の培地に交換し、さらに4日後に培地交換して培養を続け、7日後に以下の測定に用いる。

**【0018】(b) アミロイドβ1-40ペプチドによるPC12細胞のMTT還元能低下作用の測定**

上記(a)の培養7日目のPC12細胞を培地交換(180μl/well)後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解したアミロイドβ1-40ペプチド溶液を20μl/well添加する。40時間後、MTT(シグマ製)の5mg/ml PBS溶液を25μl/wellずつ添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養を続ける。4時間後に培地を吸い取り、0.04N HCl/イソプロパノールを100μl/well加えてホルマザンを溶かし、マイクロプレートリーダー(モレキュラー・デバイセス製、Vmax)を用いて比色定量(570~650nm)を行い、PC12細胞のMTT還元能の変化を測定する。

**【0019】**

**【実施例】**以下、参考例、実施例によって本発明を詳細に説明する。なお、実施例等における%表示は特に断りがない限り重量/体積%を示す。

**【0020】[参考例1]**

**アミロイドβ1-40ペプチドの合成**

以下の実施例において、アミロイドβ蛋白凝集に対する阻害活性を調べるために用いるアミロイドβ蛋白として、アミロイドβ1-40ペプチドを合成した。

**【0021】**ペプチドの合成は、Fmoc-アミノ酸を原料として、固相法により、ペプチドシンセサイザー(アプライド・バイオシステムズ製)を用いて行われた。合成終了後、ペプチドをレジンから切り出し、C<sub>18</sub>カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィー(ウォーターズ製)によってこれを精製した。得られたアミロイドβ1-40ペプチドが目的のアミノ酸配列を有していることをペプチドシーケンサー(アプライド・バイオシステムズ製)によって確認した。このようにして得られたアミロイドβ1-40ペプチドを凍結乾燥し、以下の実施例に用いた。

**【0022】[実施例1]**参考例1で得られたβ1-4

0ペプチドを2回脱イオン水で溶解し、40μMのペプチド溶液を得た。これに当量の2×PBS(Phosphate Buffered Saline)溶液を加え、20μMのペプチド溶液とした後、エッペンドルフチューブに100μlずつ分注した。次に、ハイドロキノン、p-ベンゾキノン及び1,4-ジヒドロキシナフタレンを10mM、1mMまたは0.1nMとなるようにDMSOに溶解した。これらの化合物溶液を1μlずつ、上記ペプチド溶液に加え(3チューブ/群)、攪拌した(最終的にこれら化合物の濃度は100μM、10μMまたは1μMとなる)。コントロールにはDMSOのみを1μlずつ、上記ペプチド溶液を加えた。これらを、37℃でインキュベートし、上記試験方法(1)に従って、一週間後にβ1-40ペプチドの凝集を測定した。その結果、図1に示すように、ハイドロキノン、p-ベンゾキノンおよび1,4-ジヒドロキシナフタレンは濃度依存的にβ1-40ペプチドの凝集を抑制した。

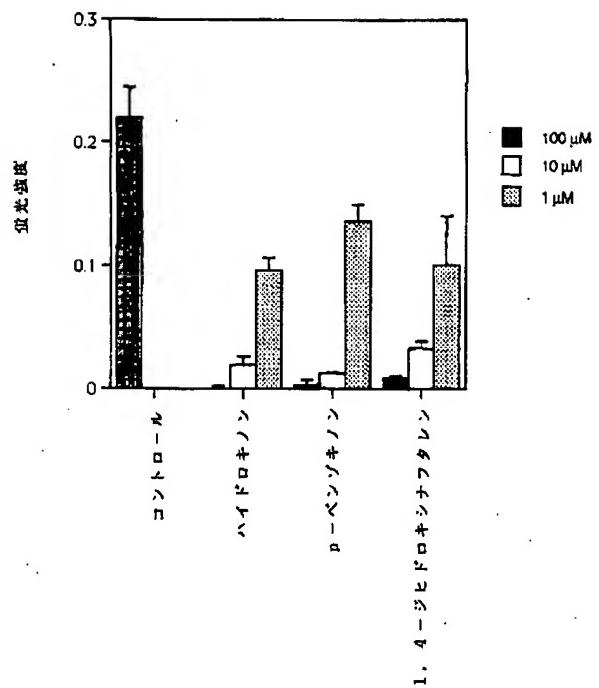
**【0023】[実施例2]**上記実施例1において、37℃で1週間インキュベートした各サンプルにつき、上記試験方法(2)に従って、神経細胞毒性を測定した。その結果、図2に示すように、ハイドロキノン、p-ベンゾキノンおよび1,4-ジヒドロキシナフタレンは、アミロイドβ1-40ペプチド20μMに対し、化合物100μMでインキュベートした時(β1-40ペプチド、化合物の最終濃度は各々2μM、10μMとなる)に、アミロイドβ1-40ペプチドの毒性を完全に抑制した。

**【図面の簡単な説明】**

**【図1】**図1は、実施例1における、本発明のアミロイドβ蛋白凝集沈着阻害剤によるβ1-40ペプチドの凝集抑制効果を示す。図中の棒グラフの表示は、コントロールは本発明の化合物(-)、ハイドロキノン、p-ベンゾキノン、1,4-ジヒドロキシナフタレンについては、それぞれ最終濃度100μM(黒棒グラフ)、10μM(白棒グラフ)、1μM(点棒グラフ)を示す。

**【図2】**図2は、実施例2における、本発明のアミロイドβ蛋白凝集沈着阻害剤による神経細胞毒性抑制(MTT還元能低下作用)効果を示す。図中の棒グラフの表示は、コントロールは本発明の化合物(-)、ハイドロキノン、p-ベンゾキノン、1,4-ジヒドロキシナフタレンについては、それぞれ最終濃度10μM(黒棒グラフ)、1μM(白棒グラフ)、0.1μM(点棒グラフ)を示す。

【図1】



【図2】

